

稳定同位素稀释-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定牛奶及牛源性婴幼儿配方乳粉中 A1 型和 A2 型 β -酪蛋白含量

冯 鑫¹, 吕 佳², 别 玮¹, 韩 深¹, 张晓梅³, 王金花^{1*},
鲍 蕾^{2*}, 汪龙飞², 梁成珠³, 吕美玲⁴

[1. 中国海关科学技术研究中心, 北京 100026; 2. 雀巢研发(中国)有限公司, 北京 100016;
3. 青岛海关技术中心, 青岛 266104; 4. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京 100022]

摘 要: **目的** 建立基于纯化蛋白和稳定同位素稀释-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(ultra performance liquid chromatography coupled triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-MS/MS)定性及定量测定牛奶及牛源性婴幼儿配方乳粉中 A1 和 A2 β -酪蛋白变异体的分析方法。**方法** 首先将 β -酪蛋白标准品中 A1 和 A2 β -酪蛋白变异体在高效液相色谱仪上分离, 通过各自的纯化蛋白确定两种变异体在标准品中的含量, 再将试样中的 β -酪蛋白经胰蛋白酶酶解成肽, 经 UPLC-MS/MS 检测。通过筛选的特异肽段, 经 β -酪蛋白标准品及稳定同位素稀释内标法计算, 获得试样中 β -酪蛋白 A1 变异体和 A2 变异体的含量。**结果** 本研究采用的 β -酪蛋白标准对照品中 A1 和 A2 β -酪蛋白变异体含量分别为 20.8%和 55.1%, 且在检测中标准曲线的线性相关系数均大于 0.99, 方法重现性中相对标准偏差为 2.290%~4.720%。**结论** 本方法溯源性及精密度好, 适用于牛奶及牛源性婴幼儿配方乳粉中两种 β -酪蛋白变异体的测定。

关键词: β -酪蛋白; A2 β -酪蛋白; A2 牛奶; 婴幼儿配方乳粉; 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法

Determination of A1 and A2 β -casein in milk and bovine-derived infant formula by purified protein-isotope internal standard dilution-ultra performance liquid chromatography coupled triple quadrupole mass spectrometry

FENG Xin¹, LV Jia², BIE Wei¹, HAN Shen¹, ZHANG Xiao-Mei³, WANG Jin-Hua^{1*},
BAO Lei^{2*}, WANG Long-Fei², LIANG Cheng-Zhu³, LV Mei-Ling⁴

[1. Science and Technology Research Center of China Customs, Beijing 100026, China; 2. Nestlé R&D (China) Ltd., Beijing 100016, China; 3. Technology Center of Qingdao Customs, Qingdao 266104, China; 4. Agilent Technologies (China) Co., Ltd., Beijing 100022, China]

*通信作者: 王金花, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品营养与安全。E-mail: wangjh2008@aliyun.com

鲍 蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com

*Corresponding author: WANG Jin-Hua, Ph.D, Professor, Science and Technology Research Center of China Customs, No.6, Tianshuiyuan Road, Chaoyang District, Beijing 100026, China. E-mail: wangjh2008@aliyun.com

BAO Lei, Professor, Nestlé R&D (China) Ltd., No.6, Jiuxianqiao Road, Chaoyang District, Beijing 100016, China. E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com

ABSTRACT: Objective To establish a method for the qualitative and quantitative determination of A1 and A2 β -casein in milk and bovine-derived infant formula by purified protein-isotope internal standard dilution-ultra performance liquid chromatography coupled triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Firstly, the A1 and A2 β -casein variants in the β -casein standard were separated by high performance liquid chromatography. The content of 2 kinds of variants in the standard was determined by purifying their respective proteins. Then, the β -casein in the sample was hydrolyzed into peptides by trypsin and detected by UPLC-MS/MS. By selecting specific peptide segments, the content of A1 and A2 β -casein variants in the sample was calculated using casein standard and stable isotope dilution internal standard methods. **Results** The A1 and A2 β -casein variant content in the β -casein standard reference substance used in this study were 20.8% and 55.1%, respectively. The linear correlation coefficients of the standard curve in the detection were all greater than 0.99, and the relative standard deviations in the reproducibility of the method were 2.290%-4.720%. **Conclusion** This method has good traceability and precision, and can be applied for determination of 2 kinds of β -casein variants in milk and cow's milk derived infant formula.

KEY WORDS: β -casein; A2 β -casein; A2 milk; infant formula; ultra performance liquid chromatography coupled triple quadrupole mass spectrometry

0 引言

牛奶是一种营养成分丰富的食品,是人类饮食的重要组成部分。酪蛋白(casein, CN)是牛奶中的重要营养成分之一,其含量约占总蛋白的 80%。目前研究发现, CN 主要存在 α 、 β 、 κ 3 种类型,其中 β -CN 的含量约占 CN 的 40%^[1]。与其他类型 CN 相比, β -CN 及其酶解产物具有促进人体钙、锌吸收^[2-3]等独特的功能。

自然界中 β -CN 有 12 种变异体,包括 A1、A2、A3、B、C、D、E、F、G、H1、H2 和 I^[4],其中 A1 及 A2 型最常见^[5]。研究认为 A2 β -CN 的氨基酸序列是最原始序列,目前牛种群中出现的 A1 β -CN 变异体是 A2 β -CN 氨基酸序列上第 67 位点的脯氨酸突变为组氨酸^[6]产生的,该变异会使 A1 β -CN 在人体内水解出含有 7 个氨基酸的 β -酪啡肽(β -casomorphin-7, BCM-7)^[1],这种多肽是一种乳源性生物活性阿片肽,通过激活内源性阿片受体产生生理反应^[7],而 A2 β -CN 则极少水解出内源性阿片肽类肽段^[8]。相关流行病学研究发现 BCM-7 与某些疾病之间有相关性,如可以增加 I 型糖尿病^[9]、心源性疾病^[10]、新生儿猝死^[11]、胃肠功能紊乱^[12-13]和孤独症及精神分裂等神经系统疾病^[14]的发病风险。

由于 A1 β -CN 可能会对人体健康产生一定负面影响,各乳品企业推出各类“A2 乳品”,即产品中的 β -CN 为 A2 β -CN 的乳产品,但由于各国监管机构均没有对此类产品定义,因此为市场监管带来巨大挑战。近几年出现相关检测方法,用以对“A2 乳品”开展质量控制、真实性溯源及交叉混杂情况的相关工作,并成为乳制品质量监管的重要手段之一^[15]。

现有检测方法的研究对象分为两种,其一是针对奶牛基因型的检验,包括聚合酶链式反应-限制性酶切片段多态性、检测技术^[16-17]、等位基因特异性聚合酶链式反应

(polymerase chain reaction, PCR)^[18]、TaqMan 探针法^[19]和 rhAmp 技术^[20]等,这类方法的主要目的是进行 A2 牛群的选育及奶源管理,但缺乏对加工过程中可能出现交叉混杂等情况的监管能力。另一类方法的研究对象则是针对终产品进行检测,如液态乳和乳粉等,主要方法包括高效液相色谱法^[21]、毛细管电泳法^[22]等,但这类方法仅能通过保留时间对目标化合物定性,因此当样品成分复杂时,可能会对目标化合物色谱峰产生干扰,影响最终定性或定量结果。目前通过蛋白组学技术进行分析成为主流,运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法^[23]进行定性分析,或通过三重四极杆质谱或轨道阱质谱^[24-26]等质谱仪,对完整蛋白或利用水解后的特征性肽段进行分析具备更好的定性和定量能力。其中部分定量研究利用牛 β -CN 标准品进行分析,但对牛 β -CN 对照品中的 A1 及 A2 型含量未进行明确测定,而采用面积归一法,会导致以下问题:(1)结果无法溯源,不能直接应用于市场监管;(2)结果易受标准品纯度或杂质影响。

为解决上述问题,本研究利用牛 A1、A2 β -CN 纯化蛋白对牛 β -CN 对照品中 A1、A2 β -CN 含量进行标定,再通过牛 β -CN 标准品和稳定同位素稀释-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法(ultra performance liquid chromatography coupled triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定牛奶及牛源性婴幼儿配方乳粉中 A1、A2 β -CN 的含量,该方法的建立可为企业内部质控和市场监管提供可靠依据之一。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

检测所用样品为市售 A2 及普通巴士灭菌乳样品和婴幼儿配方乳粉样品。

纯化牛 A1 β -CN 及 A2 β -CN (20 μ g, 纯度>95%, 澳大利亚 Biosensis 公司);牛 β -CN 标准品(纯度 78%, 美国

Sigma-Aldrich 公司)。

牛 A1 β -CN、牛 A2 β -CN 特异肽段及牛 A1 β -CN、牛 A2 β -CN 变异体同位素标记特异肽段(质量浓度 500 $\mu\text{g/mL}$, 纯度>90%, 上海生工生物工程公司), 详细信息见表 1。

乙酸、甲酸、乙腈、三氟乙酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 碳酸氢钠、碳酸氢铵、尿素、二水合柠檬酸三钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 二硫苏糖醇、碘代乙酰胺、盐酸胍(分析纯)、碱性胰蛋白酶(活力>10000 BAEE/mg)(美国 Sigma-Aldrich 公司)。水为 GB/T 6682—2008《分析实验室用水国家标准》规定的一级水。

1.2 仪器与设备

LC-30AD 高效液相色谱仪(配高灵敏度 DAD 检测器, 日本岛津公司); 1290 超高效液相色谱 6460 串联三重四极杆质谱仪、ZORBAX 300 SB- C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Agilent 公司); ME614S 型电子天平(感量 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); WNB45 恒温水浴(德国 Memmert 公司); Microspin-12 型微量离心机(美国 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准品溶液的配制

牛 β -CN 标准储备液(2 mg/mL): 称取 20 mg 牛 β -CN 标准品, 用水定容至 10 mL。

同位素标记特异肽混合中间溶液(50 $\mu\text{g/mL}$): 分别准确吸取 1 mL 的牛 A1 β -CN 及 A2 β -CN 同位素标记特异肽标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容至 10 mL。

1.3.2 β -CN 标准品中 A1 及 A2 β -CN 含量的测定

用 β -CN 缓冲试剂(含 6 mol/L 盐酸胍和 0.2 mol/L 二硫苏糖醇)分别将纯化牛 A1 β -CN 及 A2 β -CN 溶解并定容至 1 mL, 质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 。分别吸取 500 μL 后, 用 β -CN 缓冲试剂定容至 1 mL, 配制成质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。分别将两个质量浓度的牛 A1 β -CN 及 A2 β -CN 溶液经高效液相色谱仪分析, 色谱条件参考文献方法^[27], 进样量调整为 50 μL 。计算 A1 β -CN 及 A2 β -CN 质量浓度与响应值的线性系数。

准确吸取牛 β -CN 标准储备液 10 μL , 用 β -CN 缓冲试剂定容至 1 mL, 此时 β -CN 的质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$, 溶液

经高效液相色谱仪分析后, 通过线性关系计算求出该浓度下 A1 β -CN 及 A2 β -CN 的含量。

1.3.3 样品及 β -CN 标准品的前处理

称取 1 g 样品(精确至 0.01 g), 用尿素溶液溶解后定容至 100 mL。

准确吸取牛 β -CN 储备液 10 μL 、25 μL 、50 μL 、250 μL 、500 μL 、1 mL, 用水定容至 1 mL, 配成质量浓度为 0.02、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 mg/mL 的 β -CN 工作液, 得到标准曲线前处理液, 待烷基化和酶解。

分别准确吸取 100 μL 试样溶液和 β -CN 工作液于 2 mL 离心管中, 在 β -CN 离心管中加入 100 μL 尿素溶液(6 mol/L)后, 逐步在样品和工作液离心管中加入 50 μL 同位素标记特异肽混合中间溶液、680 μL 碳酸氢钠缓冲溶液(100 mmol/L)和 10 μL 二硫苏糖醇溶液(500 mmol/L), 涡旋混匀, 70℃恒温反应 30 min。取出冷却至室温, 加入 30 μL 碘代乙酰胺溶液, 涡旋混匀, 暗处静置 30 min, 加入 20 μL 碱性胰蛋白酶溶液(1 mg/mL), 涡旋混匀, 于 37℃恒温酶解 6 h, 完成后取出加入 10 μL 甲酸混匀, 室温静置 30 min, 过 0.22 μm 滤膜于进样瓶中, 供 UPLC-MS/MS 仪检测。

1.3.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX 300 SB- C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm), 孔径 30 nm; 流动相 A: 0.1%甲酸水溶液, 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈溶液; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40℃; 进样体积: 10 μL 。

洗脱梯度程序: 0~1.0 min, 5% B; 1.0~5.0 min, 5%~40% B; 5.0~5.5 min, 40%~100% B; 5.5~7.0 min, 100% B; 7.0~7.5 min, 100%~5% B; 7.5~10.0 min, 5% B。

1.3.5 质谱条件

离子源: 鞘流电喷雾离子源(JetStream electro spray ionization, JetStream ESI+); 扫描方式: 正离子模式扫描; 检测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 鞘气温度: 350℃; 鞘气流速: 12 L/min; 喷嘴电压: 200 V; 雾化器压力: 45 psi; 毛细管电压: 3500 V; 干燥气温度: 175℃; 干燥气流速: 11 L/min; 碰撞气: 高纯氮。

依据相关文献选择 A1 β -CN 及 A2 β -CN 特异性肽段^[24,28], 特异性肽段定性离子、定量离子及碰撞能量见表 2。

表 1 A1 及 A2 β -CN 特异性肽段相关信息
Table 1 Related informations of A1 and A2 β -CN characteristic peptides

肽段名称	序列	理论分子量
牛 A1 β -CN 特异性肽段	IHPFAQTQSLVYFPFGPIHNSLPQNIPPLT QTPVVVPFLQPEVMGVSK	5355.9
牛 A2 β -CN 特异性肽段	IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNSLPQNIPPLT QTPVVVPFLQPEVMGVSK	5315.8
牛 A1 β -CN 同位素特异性肽段	IHPFAQTQS(L*)VYFPFGPIHNS(L*) PQNIPP(L*)TQTPVVVPFL(L*)QPEVMGVSK	5387.4
牛 A2 β -CN 同位素特异性肽段	IHPFAQTQS(L*)VYFPFGPIPN(L*)PQNIPP(L*) TQTPVVVPFL(L*) QPEVMGVSK	5347.3

注: L*为同位素标记的亮氨酸(Leu-OH- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_7$)。

表 2 A1 及 A2 β -CN 特异性肽段的定性离子、定量离子及主要质谱参数信息
Table 2 Informations of qualitative and quantitative ions and main mass spectrometry parameters of A1 and A2 β -CN characteristic peptides

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
牛 A1 β -CN 特异性肽段	1340.8	714.8*	160	30
		1428.5	160	30
牛 A2 β -CN 特异性肽段	1330.8	714.8*	160	30
		1428.5	160	30
牛 A1 β -CN 同位素特异性肽段	1347.8	718.4*	160	30
牛 A2 β -CN 同位素特异性肽段	1337.8	718.4*	160	30

注: *为定量离子。

1.3.6 标准曲线绘制及样品结果计算

以 β -CN 标准品中 A1 及 A2 β -CN 质量浓度为横坐标(X , mg/mL), A1 及 A2 β -CN 特异性肽段与相应内标物的峰面积比值为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。通过仪器工作站计算得出试样溶液中 A1 及 A2 β -CN 的浓度, 并计算求出试样中 A1 及 A2 β -CN 的含量。

1.4 数据处理

高效液相色谱数据通过岛津 Lab Solution 工作站进行采集和分析, UPLC-MS/MS 数据通过 Agilent Masshunter 工作站进行采集和分析, 利用 SPSS 19.0 进行数据分析及图表处理。

2 结果与分析

2.1 标准品的选择

在定量研究中选择可溯源的标准物质对目标化合物进行分析。本研究采用的方法是, 先将 β -CN 标准对照品中 A1 及 A2 β -CN 进行分离, 再通过 A1 及 A2 β -CN 纯化蛋白对两种变异体的含量进行确认。经测定后的 β -CN 标准对照品则可对样品进行定量检测。图 1 展示了通过液相色谱仪分离后, β -CN 标准对照品中 A1 及 A2 β -CN 的色谱峰。

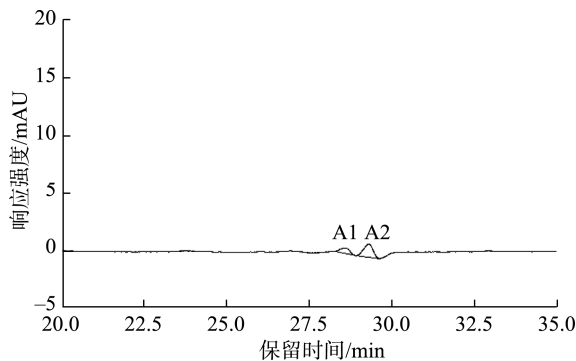


图1 β -CN标准品中A1及A2 β -CN的色谱峰
Fig.1 Chromatographic peak of A1 and A2 β -CN in β -CN standard substance

本研究也考察和分析了其他定量方法。(1)实验通过胰蛋白酶对 A1 及 A2 β -CN 纯化蛋白直接酶解, 实验结果表明其质量浓度与酶解后特征肽段质谱响应值间的线性回归系数不佳, 主要原因是蛋白在纯化过程中会加入蛋白酶抑制剂, 该抑制剂会抑制蛋白酶解过程, 因此该纯化蛋白不能用于碱性胰蛋白酶酶解后定量。(2)也有研究^[21,25]采用峰面积归一法对 β -CN 标准对照品中 A1 及 A2 β -CN 的比例进行确定, 再对样品进行定量分析, 但由于部分成分在所选检测波长下无法检出, 在使用面积归一化法计算 A1 及 A2 β -CN 比例时, 会忽视这类成分的影响, 理论上会高估两种变异体所占比例, 造成测定结果高于实际数值的情况。(3)有部分方法通过合成特征肽段对目标蛋白进行定量, 如食品补充检验方法 BJS 201915《含乳饮料及其乳原料中酪蛋白含量的测定》。本研究发现, 碱性胰蛋白酶不能将 β -CN 完全酶解, 酶解率约为 90%, 若采用合成特征肽段对 A1 及 A2 β -CN 进行检测, 理论上会导致检测数值低于实际值的情况。

表 3 展示了上述 3 种不同检测方法的结果对比情况。与本研究方法的定量方式相比, 面积归一法与合成肽段法均存在一定差距, 实验结果和上述理论分析情况一致。

表 3 不同测定方法测定 β -CN 标准对照品中 A1 及 A2 β -CN 的含量(%)
Table 3 Determination of A1 and A2 β -CN content in β -CN standard reference material by different measurement methods (%)

	纯化蛋白 定量法	面积归一法	合成肽段 定量法
A1 β -CN	20.8	22.5	17.5
A2 β -CN	55.1	58.1	48.4

2.2 碱性胰蛋白酶酶解时间的考察

实验对比了不同酶解时间条件下, 碱性胰蛋白酶对 β -CN 酶解效率的影响。图 2 展示了 β -CN 在不同酶解时间下, A1 及 A2 β -CN 特异性肽段与同位素内标比值的变化情况。由结果可知, 在酶解 4 h 后 A1 及 A2 β -CN 酶解出的特异性肽段量逐渐达到平台期, 并在酶解 6 h 后达到最大值。

自 8 h 开始出现特异性肽段与同位素内标比值下降的情况,可能的原因是出现肽段降解、卷曲折叠等,因此应控制酶解反应时间。自酶解 4~8 h 期间,比值无明显差异,但由于 4 h 后比值仍有上升趋势,为保证目标蛋白酶解更充分,因此最终确定碱性胰蛋白酶的酶解时间为 6 h。

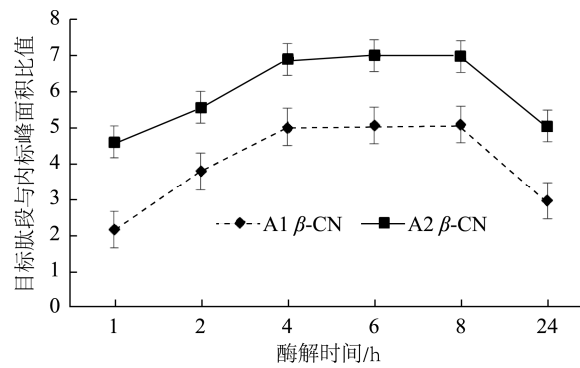


图2 不同酶解时间下A1及A2 β-CN特异性肽段响应值变化
Fig.2 Changes of response values of A1 and A2 β-CN characteristic peptides in different enzymolysis time

2.3 标准曲线线性考察

在 β-CN 标准品质量浓度为 0.02~2.00 mg/mL 范围内, A1 及 A2 β-CN 的线性回归方程及线性系数见表 4, 结果表明在该范围内, 标准曲线线性关系良好。

表 4 两种 β-CN 成分的回归方程及线性系数
Table 4 Regression equation and correlation coefficient of 2 kinds of β-CN

成分名称	线性回归方程	线性系数(r^2)
A1 β-CN	$Y=53.736X-0.0597$	0.994
A2 β-CN	$Y=57.606X+1.2924$	0.994

注: 回归方程中 X、Y 分别为目标化合物与对应内标物的浓度比和响应值比。

2.4 方法精密度考察

为评价检测方法的精密度, 选择市售普通巴氏灭菌乳、A2 巴氏灭菌乳、普通婴儿配方乳粉和 A2 婴儿配方乳粉进行 6 次平行测定。样品检测结果及相对标准差结果见表 5。结果的相对标准偏差满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的有关要求。

2.5 实际样品检测

除上述样品外, 对其他市售 6 份标称 A2 奶源的奶粉样品进行测定, 并对 A2 β-CN 占 A1 及 A2 β-CN 之和的比例进行计算, 结果见表 6。从结果中发现, 标称 A2 奶源的奶粉中, A2 β-CN 的占比均大于 85%。虽然目前世界范围内均未对 A2 奶粉中 A2 β-CN 含量进行规定, 无法从法规上判断产品是否符合要求, 但通过本研究得出的数据计算发现, 宣称 A2 奶粉的产品中 A2 β-CN 占比明显, 可以佐证产品的真实性。

表 5 不同市售样品中 A1、A2 β-CN 含量测定结果及相对标准偏差
Table 5 Determination results and relative standard deviation of A1 and A2 β-CN content in different commercial samples

样品名称	化合物	测定结果/(g/100 g)						平均值 /(g/100 g)	相对标准偏差 /%
		1	2	3	4	5	6		
某品牌巴氏 灭菌乳	A1	0.394	0.427	0.411	0.402	0.432	0.418	0.414	3.210
	A2	0.781	0.827	0.775	0.808	0.815	0.797	0.801	2.290
某品牌 A2 巴氏 灭菌乳	A1	0.025	0.023	0.023	0.024	0.024	0.022	0.024	4.720
	A2	1.045	1.064	1.016	1.112	1.021	1.055	1.052	3.020
某品牌婴儿 配方乳粉	A1	0.400	0.429	0.421	0.444	0.425	0.408	0.421	3.380
	A2	0.841	0.960	0.891	0.888	0.846	0.912	0.890	4.530
某品牌 A2 婴儿 配方乳粉	A1	0.123	0.110	0.118	0.115	0.119	0.122	0.118	3.710
	A2	1.325	1.340	1.313	1.440	1.256	1.414	1.348	4.600

表 6 不同市售样品中 A1、A2 β-CN 含量测定结果及 A2 β-CN 占比
Table 6 Determination results and A2 β-CN proportion of A1 and A2 β-CN content in different commercial samples

样品 名称	A1 β-CN 含量/(g/100 g)	A2 β-CN 含量/(g/100 g)	A1 与 A2 β-CN 含量之和/(g/100 g)	A2 β-CN 占比/%
样品 1	0.118	1.348	1.466	92.0
样品 2	0.164	1.501	1.665	90.2
样品 3	0.136	2.003	2.139	93.6
样品 4	0.120	6.696	6.816	98.2
样品 5	0.142	8.632	8.774	98.4
样品 6	0.363	2.101	2.464	85.3
样品 7	0.242	1.502	1.744	86.1

3 结论与讨论

本研究通过对不同标准品定值方式的实验和对比, 最终选择采用纯化蛋白对 β -CN 标准对照品中的 A1 及 A2 β -CN 含量进行测定。本研究将已定值的标准对照品和牛奶及牛源性婴幼儿配方乳粉样品一同经碱性胰蛋白酶水解, 通过稳定同位素稀释, 使用 UPLC-MS/MS 对样品中的 A1 及 A2 β -CN 含量进行测定。该方法基本解决了 β -CN 标准对照品中两种变异体的定值问题, 结果具有溯源性, 且方法线性回归系数及精密度满足 GB/T 27404—2008 的基本要求, 可作为标准化的方法对样品中的相关成分进行测定。同时, 方法对实际样品进行测定, 为“A2 奶粉”概念的定义提供一定数据基础, 可作为鉴别产品真伪的可靠方法^[29]。

但在研究中发现, 对原奶以及同一原奶加工成的奶粉进行检测, A2 β -CN 含量有 5%~10% 的损失。可能是因为原奶在喷粉过程中受热发生美拉德反应^[30], 使蛋白质上的酪氨酸发生糖基化, 而胰蛋白酶酶切位点为酪氨酸, 从而影响胰蛋白酶酶切。但美拉德反应产生的糖基化酪蛋白与人体正常产生的糖蛋白不同^[31], 出现生理功能降低和改变的情况^[32-33], 因此是否应当将美拉德反应产生的糖基化 β -CN 归为 β -CN 尚需进一步讨论。

本研究所采用的是蛋白质组学中用到的 Bottom up 方法, 在未来研究中考虑采用 Top down 方法对 A1 及 A2 β -CN 开展更深入的检测和方法开发, 进一步解决糖基化蛋白在检测过程中产生的影响。

参考文献

- [1] ASLEDOTTIR T, LE TT, PETRAT-MELIN B, *et al.* Identification of bioactive peptides and quantification of β -casomorphin-7 from bovine β -casein A1, A2 and I after *ex vivo* gastrointestinal digestion [J]. *Int Dairy J*, 2017, (71): 98–106.
- [2] PERES JM, BOUHALLAB S, PETIT C, *et al.* Improvement of zinc intestinal absorption and reduction of zinc/iron interaction using metal bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of beta-casein [J]. *Reprod Nutr Dev*, 1998, 38(4): 465–472.
- [3] HANSEN M, SANDSTROM B, LONNERDAL B. The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells [J]. *Pediatr Res*, 1996, 40(4): 547–552.
- [4] FARRELL HJ, JIMENEZ-FLORES R, BLECK GT, *et al.* Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision [J]. *J Dairy Sci*, 2004, 87(6): 1641–1674.
- [5] KAMINSKI S, CIESLINSKA A, KOSTYRA E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health [J]. *J Appl Genet*, 2007, 48(3): 189–198.
- [6] PAL S, WOODFORD K, KUKULJAN S, *et al.* Milk intolerance, beta-casein and lactose [J]. *Nutrients*, 2015, 7(9): 7285–7297.

- [7] ARTYM J, ZIMECKI M. Milk-derived proteins and peptides in clinical trials [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67: 800–816.
- [8] JINSMAY Y, YOSHIKAWA M. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein [J]. *Peptides*, 1999, 20(8): 957–962.
- [9] ELLIOTT RB, HARRIS DP, HILL JP, *et al.* Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption [J]. *Diabetologia*, 1999, 42(3): 292–296.
- [10] SHENG CX, ZHANG CJ, LI YZ, *et al.* Effect of beta-casomorphin-7 on myocardial hypertrophy in hyperthyroidism-induced cardiomyopathy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11): 6380–6389.
- [11] SUN Z, ZHANG Z, WANG X, *et al.* Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome [J]. *Peptides*, 2003, 24(6): 937–943.
- [12] CATTANEO S, STUKNYTE M, MASOTTI F, *et al.* Protein breakdown and release of beta-casomorphins during *in vitro* gastro-intestinal digestion of sterilised model systems of liquid infant formula [J]. *Food Chem*, 2017, 217: 476–482.
- [13] PICA V, STUKNYTE M, MASOTTI F, *et al.* Model infant biscuits release the opioid-acting peptides milk beta-casomorphins and gluten exorphins after *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. *Food Chem*, 2021, 362: 130262.
- [14] CADE R, PRIVETTE M, FREGLY M, *et al.* Autism and schizophrenia: Intestinal disorders [J]. *Nutr Neurosci*, 2000, 3(1): 57–72.
- [15] GIRIBALDI M, LAMBERTI C, CIRINCIONE S, *et al.* A2 milk and BCM-7 peptide as emerging parameters of milk quality [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 842375.
- [16] AYAZ S, SUHAIL SM, AHMAD I, *et al.* Detection of A2A2 genotype of beta casein protein (CSN2) gene in local, exotic and cross bred cattle in Pakistan [J]. *Anim Biotechnol*, 2022. DOI: 10.1080/10495398.2022.2031204
- [17] PANDEY A, THAKUR MS, PANDEY Y. Polymorphism of beta casein gene and their association with milk production traits in Malvi and Nimari breeds of cattle [J]. *Indian J Anim Res*, 2020, 5(54): 647–650.
- [18] GHOLAMI M, HAFEZIAN SH, RAHIMI G, *et al.* Allele specific-PCR and melting curve analysis showed relatively high frequency of beta-casein gene A1 allele in Iranian Holstein, Simmental and native cows [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2016, 62(12): 138–143.
- [19] MANGA I, DVOŘÁK J. TaqMan allelic discrimination assay for A1 and A2 alleles of the bovine CSN2 gene [J]. *Czech J Anim Sci*, 2010, 8(55): 307–312.
- [20] GIGLIOTTI R, GUTMANIS G, KATIKI LM, *et al.* New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples [J]. *Food Chem*, 2020, 313: 126167.
- [21] 袁兆丰, 杨秀梅, 王丹. 乳制品中 A1 β -酪蛋白、A2 β -酪蛋白含量的测定[J]. *中国乳业*, 2022, (4): 77–81.
- YUAN ZF, YANG XM, WANG D. Determination of A1 β -casein and A2 β -casein in dairy products [J]. *China Dairy Ind*, 2022, (4): 77–81.
- [22] 冯鑫, 丁晓静, 高铁, 等. 毛细管区带电泳测定液态奶及奶粉中的 A2

- β -酪蛋白及总 β -酪蛋白[J]. 色谱, 2020, 38(6): 722–729.
- FENG P, DING XJ, GAO T, *et al.* Determination of A2 β -casein and total β -casein in cow milk and milk powder by capillary zone electrophoresis [J]. Chin J Chromatogr, 2020, 38(6): 722–729.
- [23] DI FL, GIROLAMO F, MENNINI M, *et al.* A MALDI-TOF MS approach for mammalian, human, and formula milks' profiling [J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1238.
- [24] DE PR, DOMINICIS E, GRITTI E, *et al.* Development of an LC-MS method for the identification of β -casein genetic variants in bovine milk [J]. Food Anal Method, 2020, (13): 2177–2187.
- [25] EHLING S, WANG M, WEBER L. Determination of total and A1-type beta-casein in milk and milk-derived ingredients by liquid chromatography-mass spectrometry using characteristic tryptic peptides [J]. J AOAC Int, 2021, 104(6): 1559–1566.
- [26] NGUYEN DD, SOLAH VA, BUSETTI F, *et al.* Application of ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (orbitrap) for the determination of beta-casein phenotypes in cow milk [J]. Food Chem, 2020, 307: 125532.
- [27] 兰丽, 张彩霞, 高万东, 等. 液相色谱法测定超高温灭菌乳中蛋白含量[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(2): 18–23.
- LAN L, ZHANG CX, GAO WD, *et al.* Determination of protein content in ultra high temperature milk by liquid chromatography [J]. J Dairy Sci Technol, 2022, 45(2): 18–23.
- [28] 刘泽阳, 李明, 吴佩泽, 等. 液相色谱-高分辨串联质谱法检测牛奶中 A1 和 A2 β -酪蛋白[J]. 吉林大学学报(理学版), 2021, 59(3): 696–702.
- LIU ZY, LI M, WU PZ, *et al.* Determination of A1 and A2 β -casein in milk by liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry [J]. J Jilin Univ (Sci Ed), 2021, 59(3): 696–702.
- [29] 付尚辰, 李玲, 郑卫民, 等. 掺假羊乳及其制品中牛乳的检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3000–3007.
- FU SC, LI L, ZHENG WM, *et al.* Research progress on adulteration detection technology of cow milk in goat milk and its products [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(8): 3000–3007.
- [30] ZHANG Y, YI S, LU J, *et al.* Effect of different heat treatments on the Maillard reaction products, volatile compounds and glycation level of milk [J]. Int Dairy J, 2021, 123: 105182.
- [31] DINGESS KA, GAZI I, TOORN H, *et al.* Monitoring human milk beta-casein phosphorylation and O-glycosylation over lactation reveals distinct differences between the proteome and endogenous peptidome [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8140.
- [32] BIRLOUEZ-ARAGON I, PISCHETSRIEDER M, LECLÈRE J, *et al.* Assessment of protein glycation markers in infant formulas [J]. Food Chem, 2004, 87(2): 253–259.
- [33] 时佳, 刘宛宁, 付余, 等. 酪蛋白糖基化对其胰蛋白酶消化物在免疫低下模型小鼠中免疫活性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(5): 122–127.
- SHI J, LIU WN, FU Y, *et al.* Effect of casein glycation on immunoenhancing activity of tryptic caseinate digest in immunosuppressed mice [J]. Food Sci, 2020, 41(5): 122–127.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



冯 鑫, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: draconpku@hotmail.com



王金花, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品营养与安全。

E-mail: wangjh2008@aliyun.com



鲍 蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。

E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com